

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 11 月 3 日 (03.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/103237 A1

(51) 国際特許分類: C12N 7/01, A61K 35/76, A61P 35/00, C12N 15/869 // A61K 48/00

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 藤堂 具紀 (TODO, Tomoki) [JP/JP]; 〒1350044 東京都江東区越中島 1-3-17-110 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006396

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 31 日 (31.03.2005)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福原 浩 (FUKUHARA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1050014 東京都港区芝 2-26-2-401 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

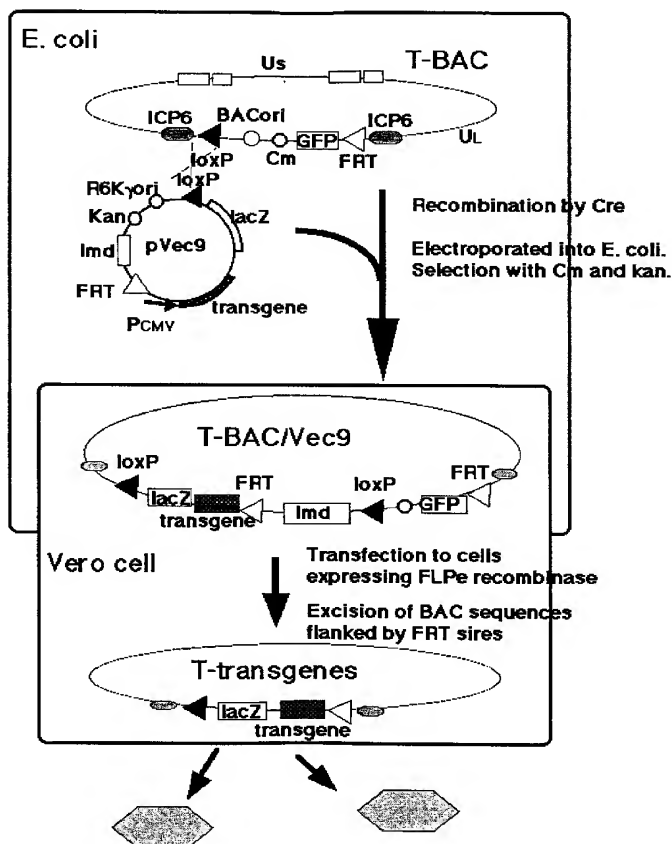
(30) 優先権データ:
特願2004-105273 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004) JP

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING RECOMBINANT HERPES SIMPLEX VIRUS

(54) 発明の名称: 組換え単純ヘルペスウイルスの作製方法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of quickly and surely preparing a recombinant herpes simplex virus (HSV) whereby a target protein can be expressed in cancer cells. This method of constructing a recombinant HSV comprises: the first step of inserting a BAC plasmid, which has a loxP site and an FRT site and has at least one expression cassette of a marker gene inserted between the loxP site and the FRT site into the herpes simplex virus (HSV) genome; the second step of constructing a shuttle vector having at least one expression cassette of a gene encoding the target protein, at least one marker gene and a loxP site and an FRT site individually inserted thereinto and inserting the shuttle vector into the loxP site of the HSV genome with the use of Cre recombinase; and the third step of coinfecting a host with the HSV genome and a vector capable of expressing Flp recombinase, excising the area between the FRT sites on the genome, and thus producing the target transgenic HSV.

(57) 要約: 癌細胞において目的タンパク質を発現させることが可能な組換え単純ヘルペスウイルス (HSV) を、迅速かつ確実に作成する方法を提供する。本発明に係る組換え HSV の作製方法は、loxP 部位および FRT 部位を有し、loxP 部位と FRT 部位との間にマーカー遺伝子の発現カセットが少なくとも 1 種類挿入された BAC プラスミドを、単純ヘルペスウイルス (HSV) ゲノムに挿入する第一工程と、目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセットが少なくとも 1 種類と、少なくとも 1 種類のマーカー遺伝子と、loxP 部位および FRT 部位と、がそれぞれ挿入されたシャトルベクターを作製し、

Cre リコンビナーゼを用いてシャトルベクターを HSV ゲノムの loxP 部位に挿入する第二工程と、HSV ゲノムと、Flp リコンビナーゼを発現可能なベクターと、

[続葉有]

WO 2005/103237 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

組換え単純ヘルペスウイルスの作製方法

技術分野

- [0001] 本発明は、標的細胞において目的のタンパク質を発現させることが可能な遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスの作製方法、およびこの組換えヘルペスウイルスを含む医薬組成物に関する。

背景技術

- [0002] 近年、ウイルス感染の分子細胞的機構および癌発生に関する遺伝学的機序や癌細胞増殖の分子生物学的機構などの知見に基づいて、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するウイルスを作製して、癌治療に応用する試みがなされている。
- [0003] 遺伝子組換えウイルスを癌治療に応用するという概念は、1991年にMartuzaらにより提唱された(例えば、非特許文献1を参照。)。ウイルスはそれ自体病原性を有するものが多く、そのままヒト等に投与すると正常細胞にも悪影響を及ぼす。しかし、遺伝子組換えで特定の遺伝子を欠失または変異させることによって、正常細胞ではウイルス複製ができないが、増殖が盛んな腫瘍細胞では欠落した遺伝子の機能が補償されるなどにより複製できるウイルスを作製することができる。
- [0004] 遺伝子組換えによって癌細胞内のみで選択的に複製するよう改変された癌治療ウイルスは、癌細胞に感染するとin situで複製し、その過程で宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲に散らばって再び癌細胞に感染し、その後、複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。一方、正常細胞に感染した治療用ウイルスは複製しないため、正常組織には害が生じない。
- [0005] このような変異ウイルスとして、これまでに、単純ヘルペスウイルスI型(以下「HSV-1」という。)ゲノムから、チミジンキナーゼ(tk)遺伝子を欠失させた変異ウイルス(例えば、上記非特許文献1を参照。)、 γ 34.5遺伝子を欠失させ、ICP6遺伝子を不活化させたHSV-1(以下「G207」と言う。)(例えば、非特許文献2～14を参照)、 γ 34.5遺伝子およびICP6遺伝子に加え、ICP47遺伝子(α 47遺伝子ともいう)も不活

化させたHSV-1(以下「G47Δ」という。例えば、特許文献1および非特許文献15を参照。)等が開発されている。これらの変異ウイルスは、正常細胞では複製できないが、腫瘍細胞では複製する能力を保持する。特にG47Δは、3つの遺伝子を変異させたことにより、腫瘍特異性および安全性が高く治療用ウイルスとして非常に有用である。

- [0006] 一方、癌治療用ウイルスは、殺細胞効果を示すだけではなく、抗腫瘍免疫を惹起する機能も有している。本発明者らは、免疫系が正常なマウスを用いた研究により、腫瘍内投与された遺伝子組換えHSV-1が、腫瘍内で増殖して殺細胞効果を示すばかりでなく、特異的抗腫瘍免疫を惹起して、その抗腫瘍効果を増強することを明らかにした(例えば非特許文献6、7および16を参照)。例えば、A/Jマウスの皮下に作成したN18腫瘍(神経芽腫)へG207を腫瘍内投与すると、N18細胞に対する特異的な細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocytes; CTL)の活性上昇を伴う全身性抗腫瘍免疫が誘導され、遠隔の皮下腫瘍あるいは脳内腫瘍の増大も抑制された。G207治療で治癒したマウスは腫瘍特異的な防御免疫を獲得し、N18細胞特異的CTL活性上昇は1年以上維持された。すなわち、癌治療用HSV-1の腫瘍内投与はin situの癌ワクチンとしても作用し、腫瘍抗原の同定を必要とせず、腫瘍細胞などの培養を必要とするex vivo法に比べて簡便であり、原発巣を治療することで、全身性抗腫瘍免疫を介して転移巣をも制御できる可能性もあつて臨床上非常に有利である。
- [0007] 本発明者らは、癌治療用ウイルスを免疫刺激性遺伝子発現と組み合わせると抗腫瘍効果が増強されることを、非増殖性HSV-1ベクターであるHSV-1アンプリコン(amplicon)を用いて確認した。分泌型のT細胞共刺激因子B7. 1-Igを発現するアンプリコンを、G207をヘルパーとして作製し、得られた混合ベクターを、免疫原性の低いNeuro2a(マウス神経芽腫)の脳腫瘍あるいは皮下腫瘍に直接投与した。その結果、G207は腫瘍細胞内で複製しながら殺細胞効果を示す一方で、アンプリコンが感染腫瘍細胞から持続的にB7. 1-Igを周囲に分泌するため、強力な抗腫瘍効果と特異的抗腫瘍免疫の惹起が得られた(例えば、非特許文献17を参照)。また、インターロイキン(IL)-12発現アンプリコンとG207の組み合わせでも抗腫瘍効果の増強が得られている(例えば非特許文献18を参照)。

- [0008] ウイルス療法の抗腫瘍免疫を増強する方法としては、アンプリコンを用いる方法のほかに、治療用組換えHSV-1のゲノムに、癌の治療に關与するタンパク質をコードする遺伝子を直接組み込むことにより、ウイルスを増幅型ベクターとして機能させる方法も考えられる。アンプリコンとの組合せではなく、G207やG47 Δ 等の治療用組換えHSV-1ゲノムに治療関連タンパク質をコードする遺伝子を組み込めば、腫瘍で増幅された遺伝子配分が得られることに加え、安定して大量のベクターを常に得られるという利点がある。
- [0009] 遺伝子組換えHSV-1の作成は、従来相同組換え法によって行われてきた。相同組換えとは、外来遺伝子がゲノムに組み込まれる際、相同性の高い場所により高い確率で組み込まれる組換えをいう。従って、一つのゲノムに相同性の高い場所が複数箇所存在する場合には、外来遺伝子がどこに組み込まれるかを制御するのが困難である。特に、HSV-1の場合ゲノムが大きく、目的とする遺伝子組換え体を得るためには、何万もの候補ウイルス株のスクリーニング、選択、精製、分子細胞レベルの確認等、多大な労力が必要とされ、通常1つの遺伝子組換えHSV-1を作製するのに1~2年を要していた。
- [0010] これに対し、G207と構造が類似したMGH-1と呼ばれる遺伝子組換え型癌治療用ウイルスのゲノムに、免疫刺激性遺伝子などの癌治療用遺伝子を効率よく組み込む方法として、バクテリア人工染色体(Bacterial Artificial chromosome; BAC)を用いる方法が提案されている(非特許文献19)。この方法では、まず、癌治療用ウイルスのゲノムに、治療用遺伝子と、Creリコンビナーゼの標的配列であるloxP部位と、Flpリコンビナーゼの標的配列であるFRT部位と、少なくとも1つのマーカー遺伝子等を組み込んだBACプラスミドを挿入する。次に、目的の治療用遺伝子を組み込んだシヤトルベクターをこのゲノムに挿入するが、その際、相同組換えではなく、Flp-FRTシステムを利用する。これにより、目的の組換え体を得られる確率が高くなる。こうして得られたウイルスゲノムをペロ細胞に形質転換させ、さらにCre-loxPシステムを利用してゲノムの不要な領域を切り出し、ウイルスを産生させる。
- 特許文献1:US2002/0187163A1号公報
- 非特許文献1:Martuza, R.L. et al.; Science 252: 854-6 (1991)

- 非特許文献2:Chahlavi, A. et al.; Neoplasia 1: 162-169 (1999)
- 非特許文献3:Hunter, W. D. et al.; J Virol 73: 6319-6326 (1999)
- 非特許文献4:Chahlavi, A. et al.; Gene Ther 6: 1751-1758 (1999)
- 非特許文献5:Nakamura, S. et al.; Glia 28: 53-65 (1999)
- 非特許文献6:Todo, T. et al.; Hum Gene Ther 10: 2741-2755 (1999)
- 非特許文献7:Todo, T. et al.; Hum Gene Ther 10: 2869-2878 (1999)
- 非特許文献8:Todo, T. et al.; Cancer Gene Ther. 7: 939-946 (2000)
- 非特許文献9:Markert, JM. et al.; Gene Ther. 7: 867-874 (2000)
- 非特許文献10:Todo, T. et al.; Mol. Ther. 2: 588-595 (2000)
- 非特許文献11:Nakano, K. et al.; Mol. Ther. 3: 431-437 (2001)
- 非特許文献12:Varghese, S. et al.; Hum. Gene Ther. 12: 999-1010 (2001)
- 非特許文献13:Jorgensen, TJ. et al.; Neoplasia 3: 451-456 (2001)
- 非特許文献14:Todo, T. et al.; Tumor Suppressing Viruses, Genes, and Drugs—Innovative Cancer Therapy Approaches. San Diego, Academic Press:45-75 (2001)
- 非特許文献15:Todo, T. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6396-6401 (2001)
- 非特許文献16:Toda, M. et al.; Hum. Gene Ther., 10: 385-393 (1999)
- 非特許文献17:Todo, T. et al.; Cancer Res 61:153-161 (2001)
- 非特許文献18:Toda, M. et al.; J Immunol 160:4457-4464 (1998)
- 非特許文献19:Saeki, Y. et al.; Mol. Ther. 3:S45-46 (2001)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0011] しかしながら、非特許文献19の方法では、シャトルベクターを挿入する際にFlp-FRTシステムを利用するので、この反応を、Flpリコンビナーゼを発現するプラスミドを有する大腸菌内で行わせなければならない。そのため、Flpリコンビナーゼを発現するプラスミドと、シャトルベクタープラスミドの両方を大腸菌に形質転換させなければならないが、大腸菌への形質転換率は高くない。2種類のプラスミドを形質転換させる確率は、2個の独立した事象の確率の積となり、両者を含む大腸菌を得られる確率は非常に低い。また、該大腸菌は、上述のBACプラスミドが挿入されたウイルスゲノムも

有していなければならない、このように特殊な大腸菌を大量に調整するのは困難である。

[0012] また、非特許文献19の方法によれば、最終産物であるウイルスゲノム上に緑色蛍光タンパク質(以下「GFP」という。)をコードする遺伝子が残されるが、GFPは免疫原性が高く、毒性もあるため、ヒトの癌治療に応用するためには大きな支障となりうる。

[0013] さらに、この方法では、最後にCre-loxPシステムが機能して切り出される部分に赤色蛍光タンパク質(以下「RFP」という。)遺伝子を組み込んでおき、赤色の蛍光の消失によって、最終産物の選択と確認を行っている。しかしながら、RFPは発現のタイミングが遅く、しかも蛍光も十分に明るくないため検知に最適であるとはいえない。その結果、例えば、Cre-loxPが正常に機能せず、不要な配列が切り出されていないウイルスゲノムも、目的のゲノムとして選択されてしまう可能性がある。このことは、特に、切り出される予定の配列中に、免疫原性や毒性のあるタンパク質をコードする遺伝子が含まれる場合、人体への応用の障害となる。

[0014] 非特許文献19の方法ではまた、治療用遺伝子のプロモーターとして、ヘルペスウイルスに固有の配列を利用したことから、相同組換えによる不測の変異が生じる可能性が高いという問題もあった。

[0015] そこで、本発明は上記の問題を解決し、癌細胞において目的タンパク質を発現させることが可能で、安全性、癌細胞におけるウイルスの複製能および抗腫瘍効果の点でも飛躍的に進歩した実用的な組換え単純ヘルペスウイルスを、迅速かつ確実に、作製する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記課題に鑑みて、鋭意研究を重ねた結果、HSVゲノムにシャトルベクターを挿入する際にCre-loxPシステムを利用することにより、従来法と比較して飛躍的に速く、目的タンパク質を発現させることが可能な組換えHSVを得られることを見出した。本発明者らは、また、最終産物のウイルスがGFPではなくlacZ遺伝子をマーカー遺伝子として有する;最終産物の選択と確認にGFPの消失を用いる;治療用遺伝子のプロモーターとして、天然のヘルペスウイルスゲノムに存在しない配列を用いる;最終段階でFlp-FRTシステムによって切り出される領域にスタッフA配

列を組み込んでおく等の設計をすることにより、本発明に係る方法をより有用なものにできることを見出した。

[0017] さらに、本発明に係る方法を用いる際、基本骨格としてG207をさらに改変した第三世代のG47 Δ ウイルスゲノムを利用することにより、安全性、癌細胞におけるウイルスの複製能、抗腫瘍効果の点で非常に優れた、実用的な組換え単純ヘルペスウイルスが得られることを確認し、本発明を完成するに至った。

[0018] 即ち、本発明は、[1]癌細胞において目的タンパク質を発現させることが可能な組換え単純ヘルペスウイルスの作製方法であって、loxP部位およびFRT部位を有し、前記loxP部位とFRT部位との間に、プロモーターの下流にマーカー遺伝子が機能的に結合された構造を有するマーカー遺伝子の発現カセットが少なくとも1種類挿入されたBACプラスミドを、単純ヘルペスウイルスゲノムに挿入する第一工程と、プロモーターの下流に前記目的タンパク質をコードする遺伝子が機能的に結合した構造を有する目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセットが少なくとも1種類と、少なくとも1種類のマーカー遺伝子と、loxP部位およびFRT部位と、がそれぞれ挿入されたシャトルベクターを作製し、Creリコンビナーゼを用いて、前記目的タンパク質をコードする遺伝子と前記マーカー遺伝子とが発現可能な構成となるように該シャトルベクターを前記単純ヘルペスウイルスゲノムのloxP部位に挿入する第二工程と、前記第二工程で得られた前記単純ヘルペスウイルスゲノムと、Flpリコンビナーゼを発現可能なベクターと、を宿主に共感染させ、該ゲノム上のFRT部位に挟まれた領域を切り出し、目的の遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスを産生させる第三工程と、を含む方法；[2]前記第二工程を液相中で行う、上記[1]に記載の方法；[3]前記第一工程に先立ち、前記単純ヘルペスウイルスの γ 34.5遺伝子およびICP6遺伝子が欠失または不活化されている、上記[1]または[2]に記載の方法；[4]さらに、前記単純ヘルペスウイルスのICP47遺伝子が欠失または不活化されている、上記[3]に記載の方法；[5]前記BACプラスミドに挿入されたマーカー遺伝子が、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子および／または抗生物質耐性遺伝子である、上記[1]から[4]のいずれか1項に記載の方法；[6]前記少なくとも1種類の目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセットに含まれるプロモーターが、天然単純ヘルペスウイ

ルスゲノムに存在しない塩基配列からなるプロモーターである、上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載の方法；〔7〕前記単純ヘルペスウイルスのゲノムに存在しない塩基配列からなるプロモーターが、CMVプロモーターである、上記〔1〕から〔6〕のいずれか1項に記載の方法；〔8〕前記シャトルベクターに挿入されたマーカー遺伝子が、lacZ遺伝子および／または抗生物質耐性遺伝子である、上記〔1〕から〔7〕のいずれか1項に記載の方法；〔9〕前記シャトルベクターに挿入されたマーカー遺伝子が、前記BACプラスミドに挿入された抗生物質耐性遺伝子とは異なる抗生物質耐性遺伝子を含む、上記〔8〕に記載の方法；〔10〕前記目的タンパク質をコードする遺伝子が、免疫刺激性遺伝子、抗血管新生作用性タンパク質、細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子および癌抑制遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子である、上記〔1〕から〔9〕のいずれか1項に記載の方法；〔11〕前記免疫刺激遺伝子が、共刺激因子、IL-12、IL-18、IL-23、IL-27およびtransporter associated with antigen processing (TAP)からなる群から選択される1以上のタンパク質をコードする遺伝子である、上記〔10〕に記載の方法；〔12〕前記抗血管新生作用タンパク質をコードする遺伝子が、エンドスタチン、アンジオスタチン、dominant negative FGF receptorおよび血小板因子4からなる群から選択される1以上のタンパク質をコードする遺伝子である、上記〔10〕に記載の方法；〔13〕前記細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子が、ウイルス表面タンパク質である、上記〔10〕に記載の方法；〔14〕前記癌抑制遺伝子が、p53遺伝子である、上記〔10〕に記載の方法；〔15〕前記シャトルベクターが、スタッフア配列を含む、上記〔1〕から〔14〕のいずれか1項に記載の方法；〔16〕前記スタッフア配列が、約5000塩基長以上である、上記〔15〕に記載の方法；〔17〕上記〔1〕から〔16〕のいずれか1項に記載の方法によって作製された組換え単純ヘルペスウイルス；〔18〕上記〔1〕から〔17〕のいずれか1項に記載の方法で作製された組換え単純ヘルペスウイルスを含む医薬組成物；〔19〕各種癌疾患の治療剤または予防剤である、上記〔18〕に記載の医薬組成物；〔20〕上記〔18〕に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌の予防または治療方法、に関する。

[0019] 本発明によれば、短期間に高い収率で目的の組換えHSVを得ることが可能となった。本方法によれば、従来1～2年を要した組換えウイルスの作製を、例えば2～3ヶ

月で行うことができ、しかも4～5種類の異なる遺伝子組換えHSVを同時に作製することができる。

[0020] また、本発明の効果は、骨格にG47 Δ HSV-1ゲノムを用いることによってさらに高められ、安全性および抗腫瘍効果がさらに高い実用的な癌治療用HSVを得ることができる。

[0021] さらに、本発明によれば、腫瘍細胞において殺細胞効果を発揮する組換えHSVに、in situでの抗腫瘍免疫を惹起する効果、癌抑制効果、抗血管新生作用効果等を付与することが可能となり、ウイルス療法の抗腫瘍効果を増強することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0022] 以下に、本発明に用いられる用語等の意義を明確にし、本発明を詳細に説明する。

[0023] 本発明に係る組換えHSVの作製方法では、まず、HSVゲノムに、BACシステムを用いてloxP部位とFRT部位を挿入する。一方、癌細胞で発現させたい目的タンパク質をコードする遺伝子は機能的に結合されたプロモーターと共にシャトルベクターに挿入しておく。このシャトルベクターにもloxP部位およびFRT部位を適当な配置に挿入しておくことにより、まずCreリコンビナーゼを用いて、シャトルベクターをHSVゲノムに挿入し、続いてFlpリコンビナーゼを用いて、このHSVゲノムから不要な部分を切り出し、目的とする変異を持ったHSVゲノムを得ることができる。

[0024] シャトルベクターをHSVゲノムに組み込む第二工程でCre-loxPシステムを利用し、Flp-FRTシステムを不要な領域を切り出す第三工程で利用することによって、第二工程まで溶液中で、例えば試験管やエッペンドルフチューブ中等で行うことができ、単純な操作で、迅速かつ高精度に組換えを行うことができる。また、第二工程でシャトルベクターを宿主細胞中に導入する必要性がなくなるので、収率を顕著に高くすることができる。

[0025] 本発明において、「組換え単純ヘルペスウイルス」とは、遺伝子組換え技術によって、癌細胞で目的タンパク質を発現させることができるように改変された単純ヘルペスウイルス(以下「HSV」という。)である限り特に限定されず、天然のHSVの遺伝子のうち、どの遺伝子を改変したものであっても、またいかなる外来遺伝子を挿入したもの

であってもよい。また、血清型はI型(HSV-1)であってもII型(HSV-II)であってもよいが、好ましくはHSV-1が用いられる。

[0026] HSV-1は、エンベロープを有する二本鎖DNAウイルスに分類され、癌治療に有利な以下の特徴を備えている。1)ヒトのあらゆる種類の細胞に感染可能である;2)ウイルスの生活環とゲノム配列が解明されている;3)ウイルス遺伝子の大半は機能が判明しており、遺伝子操作を加えることが可能である;4)ウイルスゲノムが大きい(約152kb)為に、大きな遺伝子や複数の遺伝子を組み込むことができる。さらに、HSV-1は臨床応用に適した以下の利点を備える;5)比較的低いmultiplicity of infection(MOI)で全ての細胞の死滅が可能である;6)増殖を抑制する抗ウイルス薬が存在する;7)血中抗HSV-1抗体は、ウイルスの細胞から細胞への感染拡大に影響しない;8)HSV-1に感受性を示すマウスやサルが存在するために、動物で安全性や効果の前臨床的評価を行える;9)ウイルスDNAが宿主細胞のゲノムに取り込まれず染色体外に存在する。

[0027] 本発明に用いられるHSVは、第一工程に先立って、正常細胞では増殖できず、癌細胞でのみ増殖できるよう、遺伝子組換え技術により改変された、もしくは自然に変異したHSV(以下、単に「組換えHSV」という。)が好ましい。非増幅性アンプリコンを用いる場合に比較して、組換えHSVは癌細胞で増幅するので、より多くの目的タンパク質を発現することができる。

[0028] このようなウイルスとしては、 γ 34.5遺伝子およびICP6遺伝子が欠失または不活化されているHSV、これら2つの遺伝子に加えて、さらにICP47遺伝子が欠失または不活化されているHSV等が挙げられる。

[0029] γ 34.5遺伝子産物は、double-stranded RNA-activated protein kinase(PKR)の機能に拮抗するタンパク質である。正常細胞では、HSV-1感染に呼応してPKRがリン酸化され、それが翻訳開始因子eIF-2 α をリン酸化し、その結果ウイルスのタンパク質合成が抑制される。従って、 γ 34.5遺伝子が機能しないと、正常細胞ではウイルスの複製が抑制されることになる。しかし、癌細胞、特にRasシグナル伝達経路が活性化している細胞ではPKRがすでに抑制されているため、 γ 34.5を欠失した変異HSV-1でもウイルスの複製が可能となる。

- [0030] ICP6遺伝子は、リボヌクレオチド還元酵素 (ribonucleotide reductase; RR) の大サブユニットをコードする遺伝子である。RR遺伝子を除去または不活化すると、HSV-1は非分裂細胞(正常細胞)では複製できない。しかし、分裂が盛んでRR活性が上昇した細胞では、ウイルスの欠落酵素が補われて複製が可能となる。
- [0031] ICP47タンパク質は、transporter associated with antigen processing (TAP)を阻害することによって、感染細胞のMHC Class Iの発現を低下させ、ウイルスが宿主の免疫サーベイランスから逃れるように作用する。このため、ICP47遺伝子を不活化すると、感染癌細胞のMHC Class I発現が維持されるため、抗腫瘍免疫が増強される。
- [0032] γ 34. 5遺伝子およびICP6遺伝子が欠失または不活化されたHSVとしては、例えば上述のG207やG207と構造が類似したMGH-1が挙げられ、 γ 34. 5、ICP6およびICP47遺伝子の3つが欠失若しくは不活化されたHSVとしては、例えば上述のG47 Δ が挙げられる。中でも、G47 Δ は三重変異により、複製の腫瘍特異性および安全性が高く、ウイルス療法に好適である。
- [0033] なお、本発明において、上記遺伝子(γ 34. 5遺伝子、ICP6遺伝子、ICP47遺伝子等)の発現の抑制方法は特に限定されず、遺伝子を欠失させる方法、遺伝子の途中に他のDNAを挿入して不活化させる方法等、当業者は適宜方法を選択することができる。
- [0034] 本発明に係る組み換えHSVの作製方法では、Cre-loxP系および、Flp-FRT系を利用するために、HSVゲノムにloxP部位およびFRT部位を予め組み込んでおく必要があり、このためにBACシステムを利用する。BACプラスミドは、大腸菌のF因子プラスミドをシングルコピーで持つ人工染色体であり、比較的大きなDNA断片を安定に保持することができるので、ある生物のゲノムDNAに所望の外来遺伝子を組み込むのに有用である。所望の外来遺伝子が組み込まれたBACプラスミドは大腸菌で増殖させることができ、さらに、直線化してHSVゲノムと共に宿主(例えばVero細胞や大腸菌等)にco-transfectすれば、相同組換えによってHSVゲノムに組み込むことができる。loxP部位およびFRT部位をBACプラスミドに組み込む操作、および直線化BACプラスミドおよびHSVのco-transfectは、当業者であれば自体公知またはそれに準ずる方法に従って容易に行うことができる。

- [0035] BACプラスミドがHSVゲノムに組み込まれたかどうかを確認するために、上記BACプラスミドには少なくとも1種類のマーカー遺伝子を挿入しておくことが好ましい。マーカー遺伝子としては、例えば、その遺伝子産物が発光するものや、薬剤耐性遺伝子を用いることができる。
- [0036] 遺伝子産物の発光を検出することにより、マーカーとして使用できる遺伝子としては、GFP遺伝子、RFP遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。また、薬剤耐性遺伝子としては、抗生物質耐性のものが好ましく、例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。また、 β -ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子、 β -グルクロニダーゼをコードするgusA遺伝子も、マーカー遺伝子として用いることができる。これらの遺伝子の産物である β -ガラクトシダーゼまたは β -グルクロニダーゼは、それぞれ基質を分解する反応が呈色反応であるため検出が容易で好ましい。
- [0037] 本発明に係るHSVの作製方法では、これらのマーカー遺伝子を、BACプラスミド上のloxP部位とFRT部位の間に挿入しておけば、第三工程でFlp-FRTシステムにより該マーカー遺伝子がHSVゲノムから切り出される。従って、これらのマーカー遺伝子産物が消失したことを検出することによって、Flp-FRTシステムが機能したかどうかの確認にも用いることができる。また、最終的に、HSVゲノムから切り出されるので、マーカータンパク質がヒト等の生体に有害なものであってもよい。
- [0038] 以上から、BACプラスミドに挿入されるマーカー遺伝子は、ヒトに有害であるか否かに関わらず、目的ウイルスを選択しやすいものが有用であると言え、かかるマーカー遺伝子として、発現が速く、蛍光が明るいGFPをコードする遺伝子が最も好ましい。
- [0039] 本発明で用いられるBACプラスミドには、上述のマーカー遺伝子が、プロモーターの下流に機能的に結合した構造を有するマーカー遺伝子の発現カセットが挿入される。本発明において「機能的に結合した」とは、転写因子がプロモーターに結合することにより、その下流の遺伝子の転写が開始されるように、プロモーターと遺伝子が結合していることを意味する。

- [0040] 本発明で用いられるプロモーター配列は、発現させたいマーカー遺伝子の種類等により、公知のプロモーターから適宜選択して用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス(CMV)由来プロモーター、EF-1 α プロモーター、 β アクチンプロモーター、SV40プロモーター、TKプロモーター、P_Lプロモーター、SR α プロモーター、RNA1.8プロモーターなどが挙げられる。
- [0041] なお、BACプラスミドへのloxP部位、FRT部位、およびマーカー遺伝子発現カセットの挿入は、例えばKimらの方法(Kim SY. et al.; Genome Res. 8:404-12, 1998.)、Kanameらの方法(Kaname T., Huxley C.; Gene 266:147-53, 2001.)、Leeらの方法(Lee EC. et al.; Genomics 73:56-65, 2001.)等、自体公知またはそれに準ずる方法により、適宜行うことができる。
- [0042] 本発明においてシャトルベクターには、「目的タンパク質をコードする遺伝子」が挿入されている。本発明において「目的タンパク質をコードする遺伝子」とは、癌細胞において発現させることにより、癌の治療または予防に有利な効果を示すタンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されない。このような遺伝子としては、例えば免疫刺激性遺伝子、癌の血管新生を阻害して癌の増殖を効果的に抑制する抗血管新生作用性タンパク質をコードする遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子などが挙げられる。
- [0043] 免疫刺激性遺伝子としては、分泌型B7.1(B7.1-Ig)を含む共刺激因子、IL-12、IL-18、IL-23、IL-27等のインターロイキン、transporter associated with antigen processing(TAP)等をそれぞれコードする遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子が癌細胞で発現することにより、抗腫瘍免疫が惹起され、ウイルス療法の抗腫瘍効果が増強される。
- [0044] 抗血管新生作用タンパク質をコードする遺伝子としては、エンドスタチン(endostatin)、アンジオスタチン(angiostatin)、dominant negative FGF receptor、血小板因子4等が挙げられる。これらのタンパク質が癌細胞で発現することにより、癌組織における血管新生を阻害し、癌の増殖を抑制することができる。
- [0045] 癌抑制遺伝子としては、p53、RB、WT1、NF1、NF2、DCC、APC、プロヒビチン、p16、BRCA1、MSH2、MLH1、PMS1、PMS2、VHL、IRF-1等の遺伝子お

よびこれらを含んで融合タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。癌細胞では、癌抑制遺伝子が不活化し、細胞の増殖が制限されない状態になっているため、これらの遺伝子を癌細胞に導入することによって、癌細胞の無制限な増殖を抑制することが可能となる。

- [0046] 細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子としては、ウイルス表面タンパク質をコードする遺伝子等を用いることができ、このような遺伝子として、例えば、ギボン白血病ウイルス由来の膜融合タンパク質であるGALVあるいはその変異型であるGALV. fus (GALV-FMG)をコードする遺伝子(X, Fu et al., Molecular Therapy Vol. 7, No. 6, June 2003);麻疹ウイルスタンパク質FおよびH(MV-FおよびMV-H)をコードする遺伝子(Bateman A. et al., Cancer Res 60:1492-1497, 2000);水疱性口内炎ウイルスGタンパク質をコードする遺伝子(ラブドウイルスVSV-Gエンベロープ遺伝子; Eslahi NK, Cancer Gene Ther 8:55-62, 2001);ニューカッスル病ウイルス由来の変異Fタンパク質(NDV融合タンパクの7回繰り返しモチーフ(HR3)中の1アミノ酸置換変異(L289A))をコードする遺伝子;パラミクソウイルスSV5の細胞膜融合タンパク質(SV5Fタンパク質)をコードする遺伝子(Gomez-Trevino A. et al., J Gene Med 5:483-492, 2003)等が挙げられる。

ゲノムDNAに細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子を挿入することによって、組換えHSVに感染した細胞が速やかに周囲細胞と融合するため、殺細胞効果が向上することが報告されている。

- [0047] 上述の目的タンパク質をコードする遺伝子は、該遺伝子がプロモーターの下流に機能的に結合した構造を有する発現カセットとして、シャトルベクターに挿入される。目的タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターとしては、天然のHSVのゲノムDNAには存在しないプロモーターを用いることが好ましい。かかるプロモーターとしては、上述のBACプラスミドに挿入するプロモーターが使用可能であるが、中でもCMVプロモーターが好ましい。天然HSVゲノムには存在しないプロモーター配列を用いることにより、相同組換えによる不測の変異が生じにくく、目的の組換えHSVを得られる確率をさらに高めることができる。

- [0048] 本発明で用いられるシャトルベクターには、上述のようにloxP部位およびFRT部位

が組み込まれている。これにより、Cre-loxPシステムを使用してシャトルベクターをHSVゲノムに組み込むことが可能となり、Flp-FRTシステムを使用してこのHSVゲノムから不要な配列を切り出すことができる。

[0049] また、本発明に係るシャトルベクターには、シャトルベクターがHSVウイルスに組み込まれたことを確認するために、1種類以上のマーカー遺伝子も挿入しておくことが好ましい。マーカー遺伝子としては、例えば、その遺伝子産物が発光するものや、薬剤耐性遺伝子を用いることができる。

[0050] マーカー遺伝子は特に限定されず、上述のBACプラスミドに挿入するマーカー遺伝子と同様のものを適宜選択して用いることができ、lacZ遺伝子、gasA遺伝子、GFP遺伝子、RFP遺伝子などを用いることができる。なお、シャトルベクターに組み込まれるマーカーは、Flp-FRTシステムによってHSVゲノムから切り出されず、最終産物にも残存するため、ヒトに有害なタンパク質をコードする遺伝子でないものが好ましい。ヒトに無害であって、マーカー遺伝子としての目的を果たすものとしては、例えば、lacZ遺伝子が挙げられる。

[0051] なお、シャトルベクターに挿入されるマーカー遺伝子と、BACプラスミドに挿入されるマーカー遺伝子は異なる性質を有するものが好ましい。これにより、シャトルベクターが挿入されたか否かの確認を明確に行うことができる。

[0052] これらのマーカー遺伝子は、機能的に結合されたプロモーターを含むマーカー遺伝子発現カセットとしてシャトルベクターに挿入してもよいし、シャトルベクターにはマーカー遺伝子のみ挿入し、HSVゲノムのプロモーターを利用して発現させてもよい。

[0053] また、本発明に係る組換えHSV作製方法に用いられるシャトルベクターは、スタッフア配列を有することが好ましい。スタッフア配列とは、ウイルスの生育に不要な、何の作用も及ぼさないDNA配列をいう。天然のHSVのゲノムは約152kbであり、ゲノムの大きさが約170kb以上になるとウイルスとして形を成さなくなる性質がある。本発明に係る組換えHSV作製方法の第三工程では、Flp-FRTシステムによって、HSVゲノムから不要な部分を切り出す。ここで、Flp-FRTシステムがうまく機能しなかった場合も、スタッフア配列がなければ、ゲノムの全長は170kb未満であり、ゲノム上に不要な配列を含んだままウイルスが形成される。しかし、スタッフア配列を挿入してお

けば、Flp-FRTシステムが機能しなかった場合はゲノム全長が170kbを超えるため、ウイルスが形成されなくなる。従って、本発明で挿入されるスタッフア配列は、好ましくは約5000塩基長以上、さらに好ましくは約5500塩基長以上、より好ましくは約5700塩基長以上、最も好ましくは5790塩基長以上である。組換えウイルスの作製においては、組換えがうまく起こったものと起こらなかったものを選別する工程に膨大な時間と労力が費やされるため、スタッフア配列の挿入により、組換えが起こらなかったウイルスを自動的に除去できる本方法は非常に有用である。

[0054] 目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセット、loxP部位、FRT部位、マーカー遺伝子の発現カセットおよびスタッフア配列は、当業者が自体公知またはそれに準ずる方法によって、シャトルベクターに挿入することが可能である。

[0055] 上述のように、シャトルベクターは、BACプラスミドを挿入されたHSVゲノムに、Cre-loxPシステムを利用して組み込まれ、得られたHSVゲノムは、Flpリコンビナーゼを発現可能なベクターと共に宿主に共感染させる。宿主細胞としては、HSVが感染可能で、培養できる細胞であれば特に限定されず、腫瘍細胞や、Vero細胞等を用いることができ、好ましくはヒト、サル等の哺乳動物由来の細胞が挙げられる。

[0056] Vero細胞中で、Flpリコンビナーゼが発現すると、HSVゲノム上の2箇所のFRT部位に作用して、両FRT部位に挟まれた領域をHSVゲノムから切り出す。これによって、目的の組換えHSVゲノムが得られ、HSVが産生される。最終的なウイルス株は、例えばlimiting dilution法によって単離することができ、ウイルスDNAを制限酵素で切断してサザンブロット法で解析し、確認することができる。

[0057] 本発明はまた、本発明に係る組換えHSV作製方法により作製された組換えHSVを含む医薬組成物も提供する。本発明に係る医薬組成物は、上記組換えHSVを有効成分として含有し、各種癌疾患の治療や予防に有用である。

[0058] 本発明に係る医薬組成物を医薬として使用する場合は、投与形態は特に限定されず、経口でも非経口的投与でもよい。哺乳類(例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル、等)、特にヒトに投与する場合の投与量は、症状の程度、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与時期、投与間隔、医薬製剤の性質、調剤、種類、有効成分の種類等によって異なり特に限定されないが、約 10^3 pfu

ないし約 10^{12} pfu、好ましくは約 10^7 pfuないし約 10^{10} pfu、さらに好ましくは約 10^8 pfuないし約 5×10^9 pfuを、注射投与でそれぞれ1回または数回に分けて投与することができる。

- [0059] 本発明に係る医薬組成物は、組換えHSVをそのまま用いてもよいし、自体公知の薬学的に許容できる担体や安定化剤、乳化剤等と混合し、慣用される方法により製剤化してもよい。剤形は特に限定されず、カプセル剤、シロップ剤、吸入剤、注射剤、軟膏剤、眼軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、ローション剤等が挙げられるが、特に好ましくは注射剤である。
- [0060] 経口製剤は、賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。
- [0061] 錠剤・顆粒剤の場合には、糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。
- [0062] 注射剤の場合、凍結乾燥物とすることも可能で、また、注射剤は腫瘍、静脈、動脈、皮下、筋肉、腹腔、胸腔内に投与することができる。
- [0063] 上述の医薬組成物は、各種癌疾患の予防または治療に有用である。組換えHSVを用いたウイルス療法があらゆる種類の固形癌に有効であることがすでに知られており(例えば、上記非特許文献14を参照)、本発明に係る医薬組成物は、これらの癌すべてに用いることができる。具体的疾患としては、例えば脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、膀胱癌、肺癌、乳癌、皮膚癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、黒色腫、神経芽腫等が挙げられる。
- [0064] 以下に示す本発明の参考例、実施例および試験例は例示的なものであり、本発明は以下に示す具体例に制限されるものではない。当業者は、以下に示す実施例に様々な変更を加えて本発明を最大限に実施することができ、かかる変更は本願特許請求の範囲に包含される。

実施例 1

- [0065] [組換えHSV-1の作製]

図1に、本発明に係る組換えHSV作製方法の概略を示す。図1では、目的タンパク

質をコードする遺伝子を「transgene」で表している。図1上段は、G47 Δ ウイルスゲノムよりICP6遺伝子とlacZ遺伝子を欠失させBAC配列を挿入したプラスミドのloxP部位に、CMVプロモーター下流にtransgeneが機能的に結合した発現カセットと、マーカー遺伝子(lacZおよびKan)と、loxP部位およびFRT部位とが挿入されたシャトルベクターを挿入する工程の概略を示している。図1中段および下段は、こうして作製された構築物から、FRT部位に挟まれた不要な領域をFlpリコンビナーゼによって切り出す工程の概略を示している。以下、各工程を詳細に説明する。

本実施例では、組換えHSVの骨格としてG47 Δ ウイルスゲノムを利用し、目的タンパク質をコードする遺伝子として、IL-18および／またはB7.1-Igの遺伝子を挿入した。

(BACプラスミドの調製)

ResGen社より購入したpBelobac11(7507塩基対)に以下の操作を加えた。pBelobac11プラスミドはloxP部位およびマーカー遺伝子としてクロラムフェニコール(Cm)耐性遺伝子を有している。FRT部位、GFP遺伝子およびG47 Δ DNAのICP6遺伝子を含む配列をpBelobac11プラスミドに挿入することにより、BACプラスミド(pBAC-ICP6EF)を作製した。図2にpBAC-ICP6EFの構造を示す。このpBAC-ICP6EFプラスミドからは、制限酵素Asc1で切断することにより、両端にICP6遺伝子の5'末端(約1300塩基対)および3'末端(約1200塩基対)を有する配列を得ることができる。そのICP6遺伝子間には、loxP部位とFRT部位に挟まれるように、BACプラスミドの複製部位、Cm耐性遺伝子およびGFP遺伝子が配置されている。

[0066] (BACプラスミドのG47 Δ ゲノムへの挿入)

G47 Δ DNAとpBAC-ICP6EFとを大腸菌に共感染させ、相同組換えにより、BACプラスミドをG47 Δ DNAのICP6部位に挿入した。pBAC-ICP6EFプラスミドはICP6部位の5'および3'末端しか有さないため、G47 Δ /BAC構築物(図1上段。以下「T-BAC」と称する。)はICP6部位の中央約1kbを欠損している。G47 Δ は153 kbであったところ、T-BACは、157.7 kbであった。相同組換えの結果生じたウイルスプラークを蛍光顕微鏡で観察し、GFPが発現しているT-BACを選択した。続いて、electrocompetentな大腸菌DH10Bに挿入し、Cm耐性株を選択増殖させた。

得られたT-BACを精製、制限酵素を用いて、構造を確認した。

[0067] (シャトルベクターの調製)

シャトルベクターは、癌細胞で発現させようとする目的タンパク質の種類に応じて3種類作製した。目的タンパク質をコードする遺伝子を挿入する前のプラスミド(pVec9;10569bp)を図3に示す。マーカー遺伝子としてのlacZ遺伝子およびカナマイシン(Kan)耐性遺伝子がそれぞれ発現可能に組み込まれ、loxP部位およびFRT部位、スタッファ領域を含む。スタッファ領域としてラムダ配列の一部を利用した。図中右上のCMVプロモーターの下流に位置する制限酵素の認識領域に、目的タンパク質をコードする遺伝子を組み込むことができる。制限酵素の認識領域には、BamHI、AvrII、StuI、NotI、SacIIの制限酵素部位を含み、多くの遺伝子を組み込むことが可能なように工夫されている。

[0068] 図4に、目的タンパク質としてmIL-18をコードする遺伝子を組み込んだシャトルベクターを、図5に、目的タンパク質として、B7. 1-Igを組み込んだシャトルベクターを、図6に、mIL-18とB7. 1-Igの融合タンパク質をコードする遺伝子を挿入したシャトルベクターを示す。複数の遺伝子を同時に発現させるために、脳心筋炎ウイルス(ECMV)のinternal ribosomal entry site(IRES)を使用した。

[0069] (シャトルベクターのT-BACへの挿入)

続いてCre-loxPシステムを利用して、シャトルベクターを、T-BACのloxP部位に挿入した(図1上段および中段を参照)。まず、目的の遺伝子を組み込んだシャトルベクター150ngとT-BAC1500ngおよびNewEngland社より購入したCreリコンビナーゼを1.5mlのエッペンドルフチューブに混じて30分間37℃に置いた。この課程のみで反応が終了し、このまま型通り大腸菌に形質転換した。本方法により、大腸菌内での組み換えという手間を要し、かつ複雑な段階が省略可能となった。この溶液中での反応という方法は、迅速性のみならず、間違ったウイルスを選択するリスクの軽減にも寄与していると考えられる。

[0070] 得られた組換え体から、LBプレート上で、Kan耐性およびCm耐性によって、目的産物を選択した。約80%に目的の組換えが生じていたことが確認された。

[0071] (不要配列の除去)

シャトルベクターが挿入されたT-BACを、FLPeを発現するプラスミド(pCAGGSFlpeIRESpuro)と共に、Vero細胞に共感染させ、FRT部位に挟まれた領域(14.6kb)を切り出した(図1中段および下段を参照)。FLPeは、*Saccharomyces cerevisiae*に由来する、in vitroで開発された部位特異的リコンビナーゼである。

[0072] Vero細胞に感染し、複製されたウイルスプラークを蛍光顕微鏡で観察することにより、GFPが発現していないプラークを目的プラークとして選択した。Flp-FRTシステムを用いた切り出しにより、組換えHSV-1ゲノムから、BAC配列は完全に除去される。これは、免疫原性および毒性を有するGFP遺伝子はウイルスゲノムから除去されることを意味する。この段階で回収されたウイルスの中で、GFPを発現していない目的のウイルスは99%以上を占めていた。さらに、複製させて得られたウイルスを再度Vero細胞に感染させ、GFPが発現していないプラークを選択していくという、限界希釈法により精製を2回施行し、目的のウイルスを得た。このウイルスが目的のウイルスであるかどうかについては、制限酵素を使用してサザンブロッティングにより配列を確認した。

[0073] (ウイルスの複製)

6ウェルのプレートに各ウェル 3×10^5 個ずつ細胞を播種したものを2つ用意し、一方に、MOI=0.01でウイルスを感染させた。感染後、37.0°Cで48時間静置した後、細胞を採取し、凍結-溶解を3回繰り返してライゼートを得た。こうして増えたウイルスの力価をVero細胞中で測定した。

[0074] また、6ウェルのプレートに各ウェル 1×10^6 個ずつ細胞を播種し、MOI=1でウイルスを感染させ24時間静置した後、ガンシクロビル(200ng/ml)存在下で、39.5°C、48時間インキュベートし、ELISAアッセイおよびB7染色を行った。IL-18のELISAの測定にはMBL社のキットを用いた。

[0075] これらの結果を表1に示す。

[0076] [表1]

	Replication Assay (pfu/ ml)	IL-18 (pg/ ml)	B7 staining
G47 Δ	2.0×10^7		(-)
G47 Δ·empty	7.6×10^6		(-)
G47 Δ·IL18/ B7-1	7.6×10^6	1,002	(+)
G47 Δ·IL18/ B7-2	4.4×10^6	818	(+)
G47 Δ·IL18/ B7-3	8.3×10^6	986	(+)
G47 Δ·IL18/ B7-4	5.7×10^6	338	(+)
G47 Δ·IL18-1	1.3×10^7	1,418	
G47 Δ·IL18-2	3.2×10^6	730	
G47 Δ·IL18-3	9.6×10^6	1,710	
G47 Δ·IL18-4	7.6×10^6	994	
G47 Δ·B7-1	1.6×10^7		(+)
G47 Δ·B7-2	3.9×10^6		(+)
G47 Δ·B7-3	1.2×10^7		(+)
G47 Δ·B7-4	5.8×10^6		(+)

G47 Δ emptyは、目的タンパク質をコードする遺伝子を含まない、図3に示されるプラスミドにより産生されたウイルスを意味する。

[0077] ウイルスの増殖能は、G47 Δに比較すると多少劣るものの、ウイルス療法に使用するために十分な増殖能が確認された。

[0078] G47 ΔゲノムにIL-18およびB7. 1-Ig遺伝子を組み込んで作製したウイルスでは、両方のタンパク質が同時に発現し、いずれか一方の遺伝子を組み込んだウイルスでは、それぞれのタンパク質が発現しているのが確認された。

実施例 2

[0079] [殺細胞効果の確認]

G47 Δ/IL18、G47 Δ/B7、G47 Δ/IL18/B7のin vitroにおける様々な癌細胞に対する殺細胞効果を、G47 Δ emptyと比較した。

[0080] 図7に、マウス神経芽腫の細胞株(Neuro2a)に対する試験結果を示す。低MOI(MOI=0. 1)で、G47 Δ/IL18、G47 Δ/B7、G47 Δ/IL18/B7のいずれも、G47 ΔまたはG47 Δ emptyと同等の速さの殺細胞効果を示した。

[0081] 図8に、マウス前立腺癌の細胞株(TRAMP)に対する試験結果を示す。低MOI(

MOI=0.1および0.01)で、G47 Δ /IL18、G47 Δ /B7、G47 Δ /IL18/B7のいずれも、G47 Δ またはG47 Δ emptyと同等の速さの殺細胞効果を示した。

[0082] 以上から、目的タンパク質を発現させるように改変しても、G47 Δ 細胞に匹敵する細胞毒性を維持することが確認された。

[0083] また、Neuro2a、Pr14-2(マウス前立腺癌細胞株)およびTRAMPにおける、IL-18に対するELISAアッセイを行った。結果を表2に示す。

[0084] [表2]

	mIL-18 (pg/ ml)
G47 Δ -IL18/B7 in Neuro2a	538
G47 Δ -IL18/B7 in Pr14-2	572
G47 Δ -IL18/B7 in TRAMP	806
G47 Δ -IL18 in Neuro2a	483
G47 Δ -IL18 in Pr14-2	658
G47 Δ -IL18 in TRAMP	673

いずれのウイルスも、500-800pg/mlのIL-18を発現していることを確認した。

実施例 3

[0085] [抗腫瘍効果の確認]

上述のウイルスを用いて、マウスの腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を試験した。

[0086] 5×10^6 個のTRAMP-C2マウス前立腺癌細胞を、同系のマウス(C57Bl/6;雄)に、皮下注射した。7日後、マウスをランダムにグループ分けし、この日を0日として、それぞれのウイルスによる治療を行った。それぞれのグループのマウスに、0日目および3日目に、 5×10^6 pfu/20 μ lのG47 Δ 、G47 Δ empty、G47 Δ /IL18、G47 Δ /B7、G47 Δ /IL18/B7を、腫瘍組織内に注射投与した。

[0087] 結果を図9に示す。G47 Δ /IL18/B7を投与したグループは、TRAMP-C2癌の体積が顕著に減少した。t検定にて統計的有意差を調べた。G47 Δ /IL18/B7を投与したグループは、G47 Δ /IL18を投与したグループと比較して、19日目にTRAMP-C2癌の体積が顕著に減少していることが有意水準5%で結論された。同様に、G47 Δ /IL18/B7を投与したグループは、G47 Δ /B7を投与したグルー

プと比較して、21日目にTRAMP-C2癌の体積が顕著に減少していることが有意水準5%で結論された。

- [0088] 5×10^6 個のNeuro2a細胞100 μ Lを、A/Jマウスの両側に注射投与した。TRAMP-C2モデルと同様に、 5×10^5 pfu/20 μ lのG47 Δ 、G47 Δ empty、G47 Δ /IL18、G47 Δ /B7、G47 Δ /IL18/B7を、腫瘍組織内に注射投与した。腫瘍抑制効果は、TRAMP-C2の結果と同様であった。

実施例 4

- [0089] [IL-12の発現]

24ウェルのプレートにVero細胞を 1×10^5 個ずつ播種して一晩培養し、T-BACを用いて作製したG47 Δ のICP6遺伝子が欠失したウイルス(T-empty)とG47 Δ のICP6遺伝子部位にマウスIL-12遺伝子を挿入したウイルス(T-mfIL12)のそれぞれ3クローンについて、各2ウェルずつMOI=2で1時間感染させた。37°Cと39.5°Cにて18時間培養後にその培養液を回収し、マウスIL-12の含有量をELISAアッセイにて測定した。T-emptyの感染ではまったくIL-12の発現は見られなかったが、T-mfIL12の感染では、強力なIL-12の発現が見られた。特にウイルス複製の盛んな37°Cでは、39.5°Cに比較して高い発現量が認められた。結果を表3に示す。

[表3]

	37℃	39.5℃
#1-1	19.2	5.0
#1-2	19.0	4.4
#2-1	24.0	4.2
#2-2	21.4	4.3
#3-1	24.0	6.6
#3-2	26.2	6.2

実施例 5

[0090] [マウス皮下腫瘍モデルにおけるT-mflL12の抗腫瘍効果]

左右両側の腹部に直径約5mmのNeuro2a皮下腫瘍を有するA/Jマウスを用い、G47ΔのICP6遺伝子が欠失したウイルス(T-empty)、G47ΔのICP6遺伝子部位にマウスIL-12遺伝子を挿入したウイルス(T-mflL12)および対照として10%グリセロールを含むPBS(Mock)を左側の腫瘍組織内にのみ、それぞれ0日目と3日目の2回、注射投与した(各5?6匹ずつ)。腫瘍組織を測定し、長さ×幅×高さ(mm)により体積を求めた。

結果を図に示す。左側の腫瘍に関しては、Mock投与群(◆)に比べ、T-empty投与群(■)およびT-mflL12投与群(▲)は腫瘍増大が有意に抑制された。更にT-mflL12投与群は、T-empty投与群に比べ有意に強い抗腫瘍効果を示した。また右側の遠隔腫瘍に関しては、T-empty投与群はMock投与群に比べ有意な腫瘍増大抑制効果を示さなかったが、T-mflL12投与群は、Mock投与群、T-empty投与群いずれに比べても有意な腫瘍増大抑制を示した。

この結果から、IL-12遺伝子を組み込んだ組換え単純ヘルペスウイルスは、transgeneを組み込んでいない組換え単純ヘルペスウイルスに比べ抗腫瘍効果が増強されることが確認された。

図面の簡単な説明

- [0091] [図1]本発明に係る組換えHSV-1の作製方法の概要を示す説明図である。
- [図2]本発明に係る組換えHSV-1の作製に用いられるBACプラスミドを示す。
- [図3]本発明で用いられるシャトルベクターを示す。
- [図4]IL-18遺伝子を組み込んだシャトルベクターを示す。
- [図5]B7-1-Ig遺伝子を組み込んだシャトルベクターを示す。
- [図6]IL-18遺伝子およびB7-1-Ig遺伝子を組み込んだシャトルベクターを示す。
- 。
- [図7]Neuro2aに対する殺細胞効果の試験結果を示す。
- [図8]TRAMPに対する殺細胞効果の試験結果を示す。
- [図9]IL-18および／またはB7を発現するG27Δのマウス腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果の試験結果を示す。
- [図10]IL-12を発現するG27Δのマウス腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果の試験結果を示す。

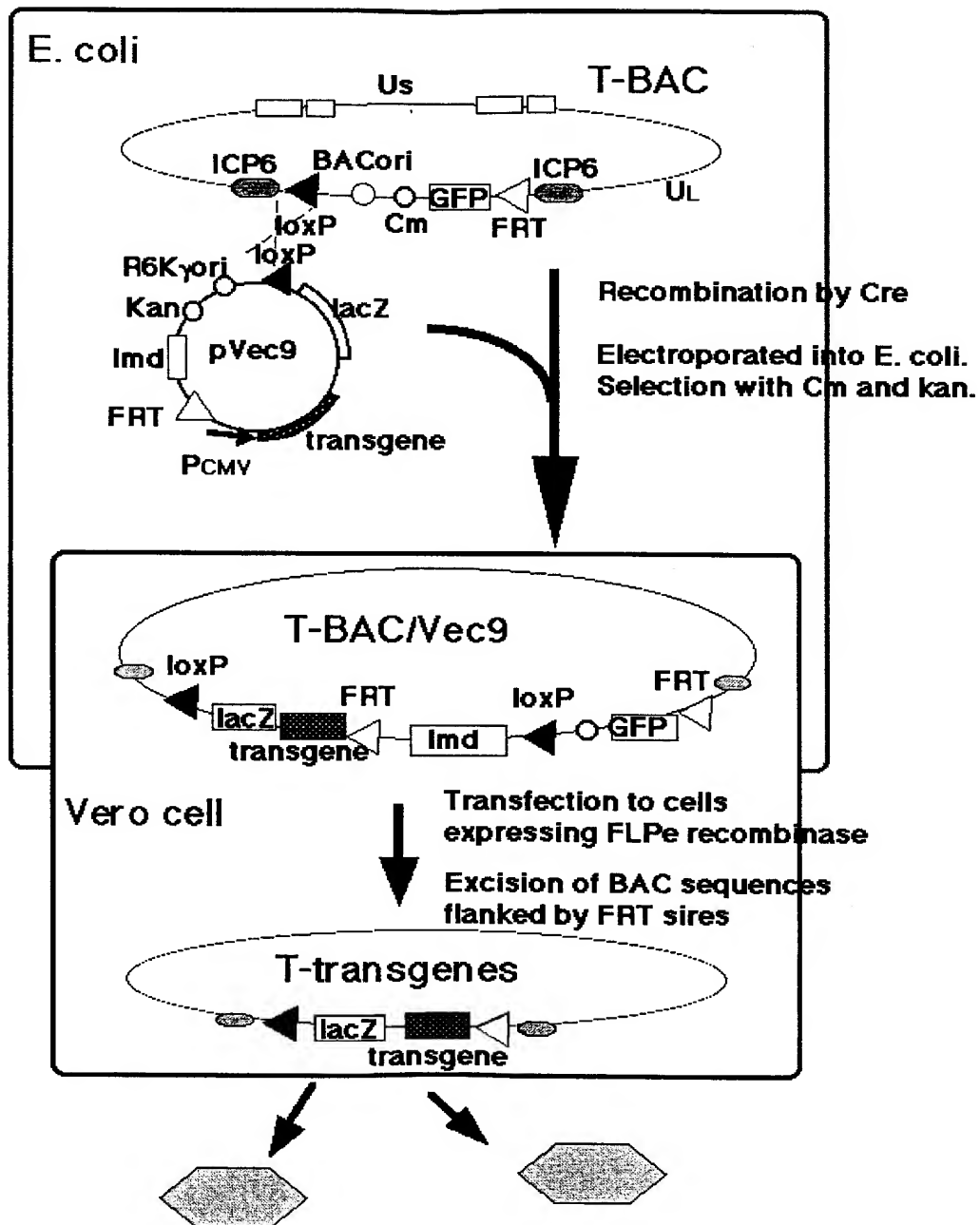
請求の範囲

- [1] 癌細胞において目的タンパク質を発現させることが可能な組換え単純ヘルペスウイルスの作製方法であって、
- loxP部位およびFRT部位を有し、前記loxP部位とFRT部位との間に、プロモーターの下流にマーカー遺伝子が機能的に結合された構造を有するマーカー遺伝子の発現カセットが少なくとも1種類挿入されたBACプラスミドを、単純ヘルペスウイルスゲノムに挿入する第一工程と、
- プロモーターの下流に前記目的タンパク質をコードする遺伝子が機能的に結合した構造を有する目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセットが少なくとも1種類と、少なくとも1種類のマーカー遺伝子と、loxP部位およびFRT部位と、がそれぞれ挿入されたシャトルベクターを作製し、Creリコンビナーゼを用いて、前記目的タンパク質をコードする遺伝子と前記マーカー遺伝子とが発現可能な構成となるように該シャトルベクターを前記単純ヘルペスウイルスゲノムのloxP部位に挿入する第二工程と、
- 前記第二工程で得られた前記単純ヘルペスウイルスゲノムと、Flpリコンビナーゼを発現可能なベクターと、を宿主に共感染させ、該ゲノム上のFRT部位に挟まれた領域を切り出し、目的の遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスを産生させる第三工程と、を含む方法。
- [2] 前記第二工程を液相中で行う、請求項1に記載の方法。
- [3] 前記第一工程に先立ち、前記単純ヘルペスウイルスの γ 34.5遺伝子およびICP6遺伝子が欠失または不活化されている、請求項1または2に記載の方法。
- [4] さらに、前記単純ヘルペスウイルスのICP47遺伝子が欠失または不活化されている、請求項3に記載の方法。
- [5] 前記BACプラスミドに挿入されたマーカー遺伝子が、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子および／または抗生物質耐性遺伝子である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [6] 前記少なくとも1種類の目的タンパク質をコードする遺伝子の発現カセットに含まれるプロモーターが、天然単純ヘルペスウイルスゲノムに存在しない塩基配列からなる

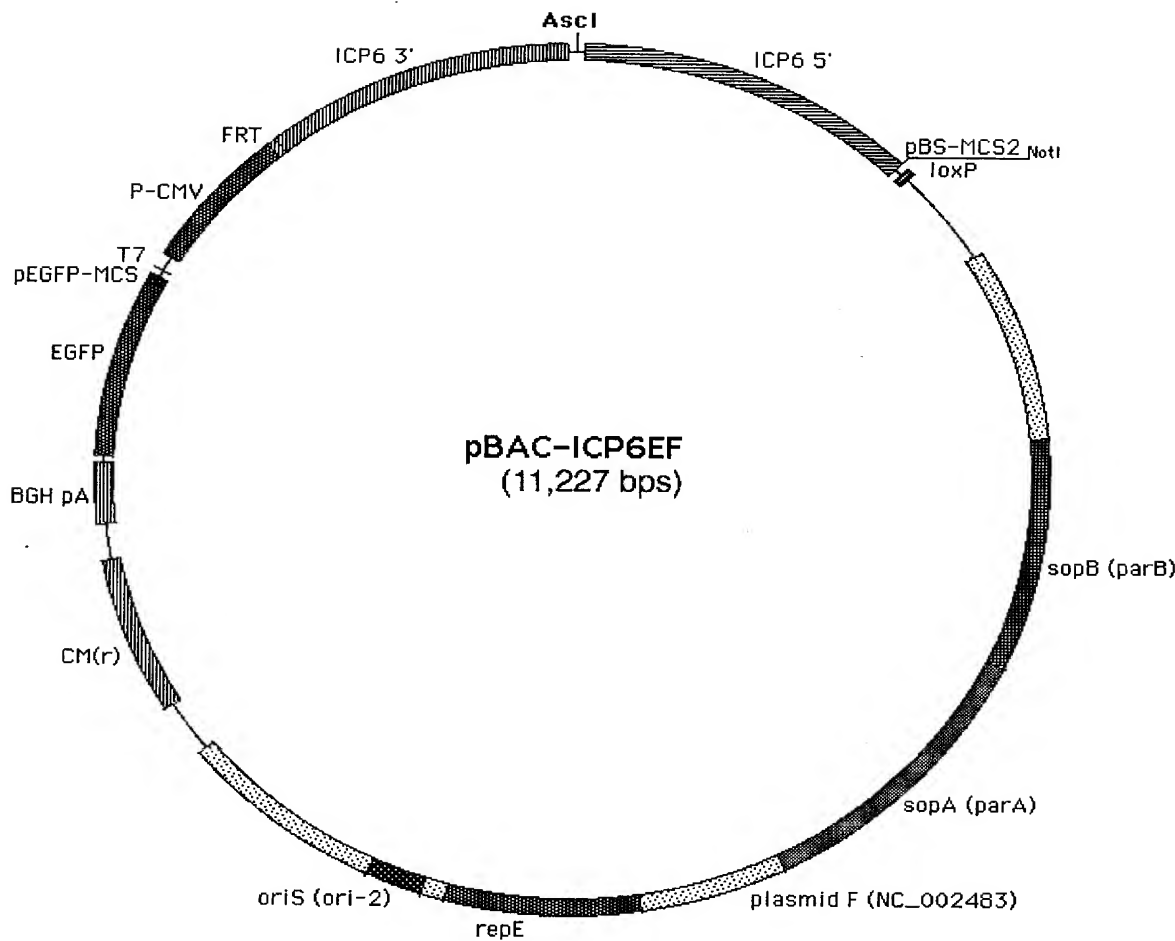
- プロモーターである、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [7] 前記単純ヘルペスウイルスのゲノムに存在しない塩基配列からなるプロモーターが、CMVプロモーターである、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [8] 前記シャトルベクターに挿入されたマーカー遺伝子が、lacZ遺伝子および／または抗生物質耐性遺伝子である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
- [9] 前記シャトルベクターに挿入されたマーカー遺伝子が、前記BACプラスミドに挿入された抗生物質耐性遺伝子とは異なる抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項8に記載の方法。
- [10] 前記目的タンパク質をコードする遺伝子が、免疫刺激性遺伝子、抗血管新生作用性タンパク質、細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子および癌抑制遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子である、請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。
- [11] 前記免疫刺激遺伝子が、共刺激因子、IL-12、IL-18、IL-23、IL-27および transporter associated with antigen processing (TAP) からなる群から選択される1以上のタンパク質をコードする遺伝子である、請求項10に記載の方法。
- [12] 前記抗血管新生作用タンパク質をコードする遺伝子が、エンドスタチン、アンジオスタチン、dominant negative FGF receptorおよび血小板因子4からなる群から選択される1以上のタンパク質をコードする遺伝子である、請求項10に記載の方法。
- [13] 前記細胞膜融合タンパク質をコードする遺伝子が、ウイルス表面タンパク質である、請求項10に記載の方法。
- [14] 前記癌抑制遺伝子が、p53遺伝子である、請求項10に記載の方法。
- [15] 前記シャトルベクターが、スタッフア配列を含む、請求項1から14のいずれか1項に記載の方法。
- [16] 前記スタッフア配列が、約5000塩基長以上である、請求項15に記載の方法。
- [17] 請求項1から16のいずれか1項に記載の方法によって作製された組換え単純ヘルペスウイルス。
- [18] 請求項17に記載の組換え単純ヘルペスウイルスを含む医薬組成物。
- [19] 各種癌疾患の治療剤または予防剤である、請求項18に記載の医薬組成物。

- [20] 請求項18に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌の予防または治療方法。

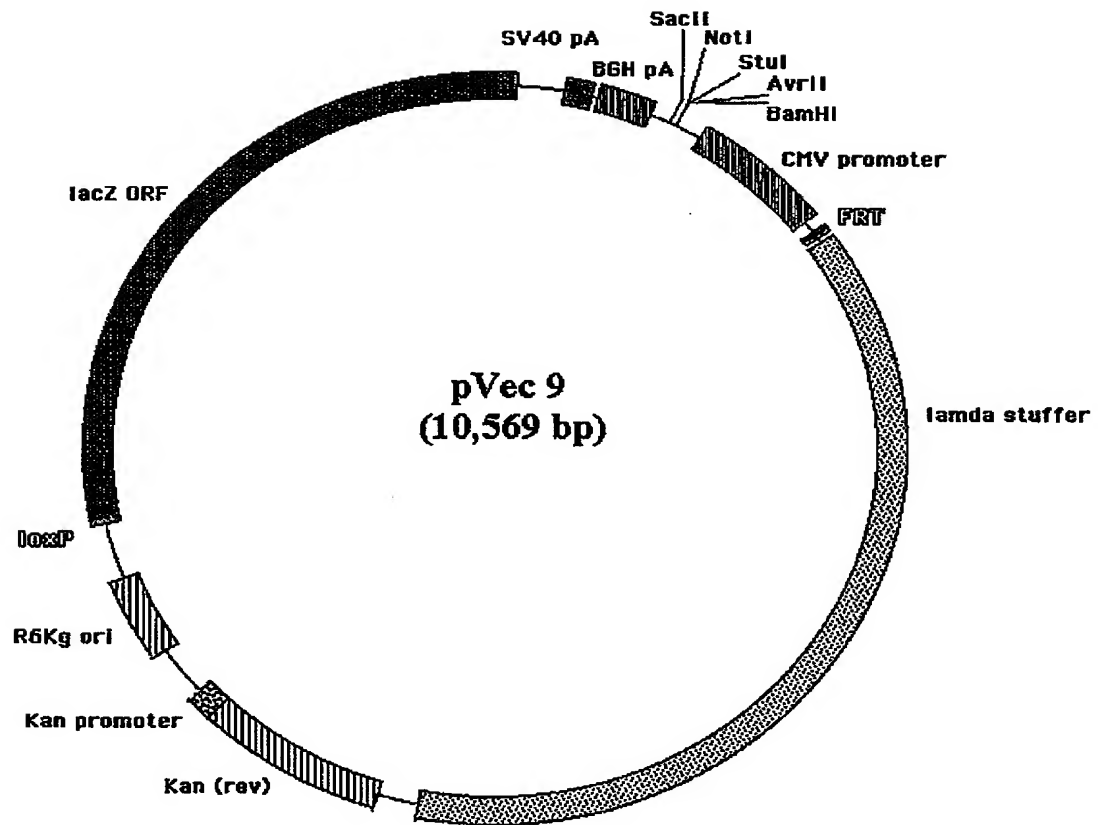
[図1]



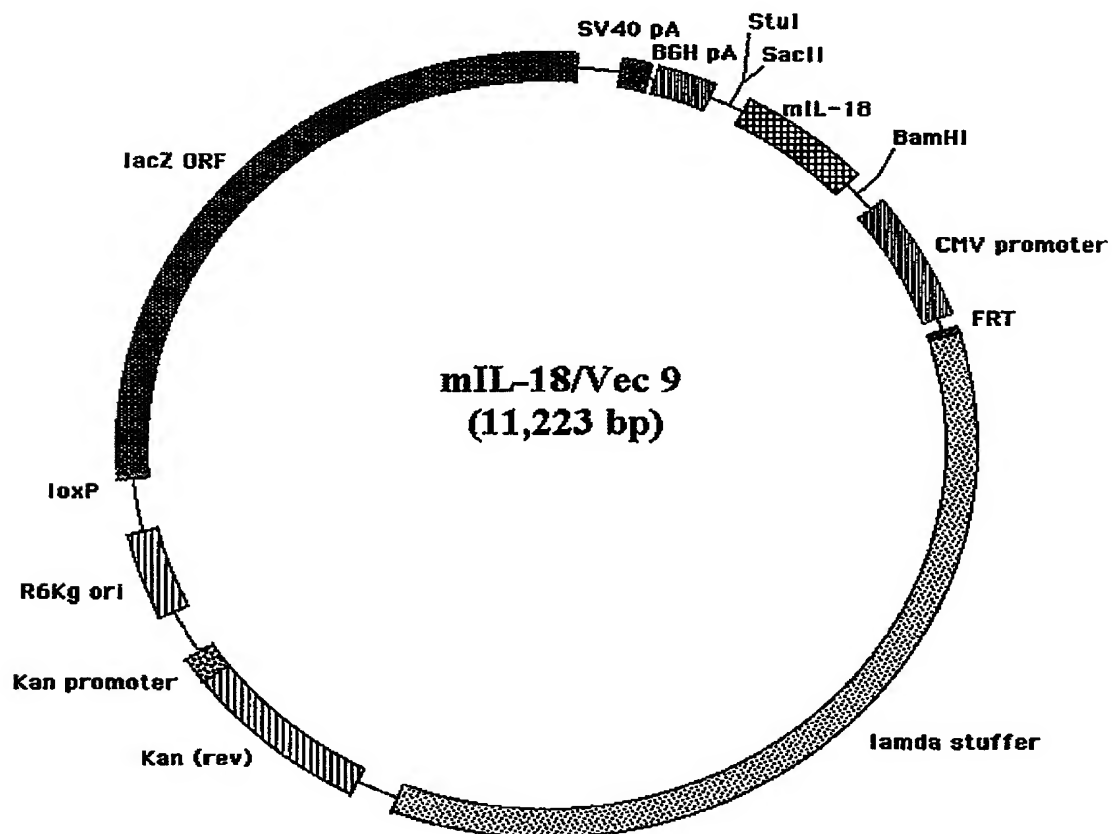
[図2]



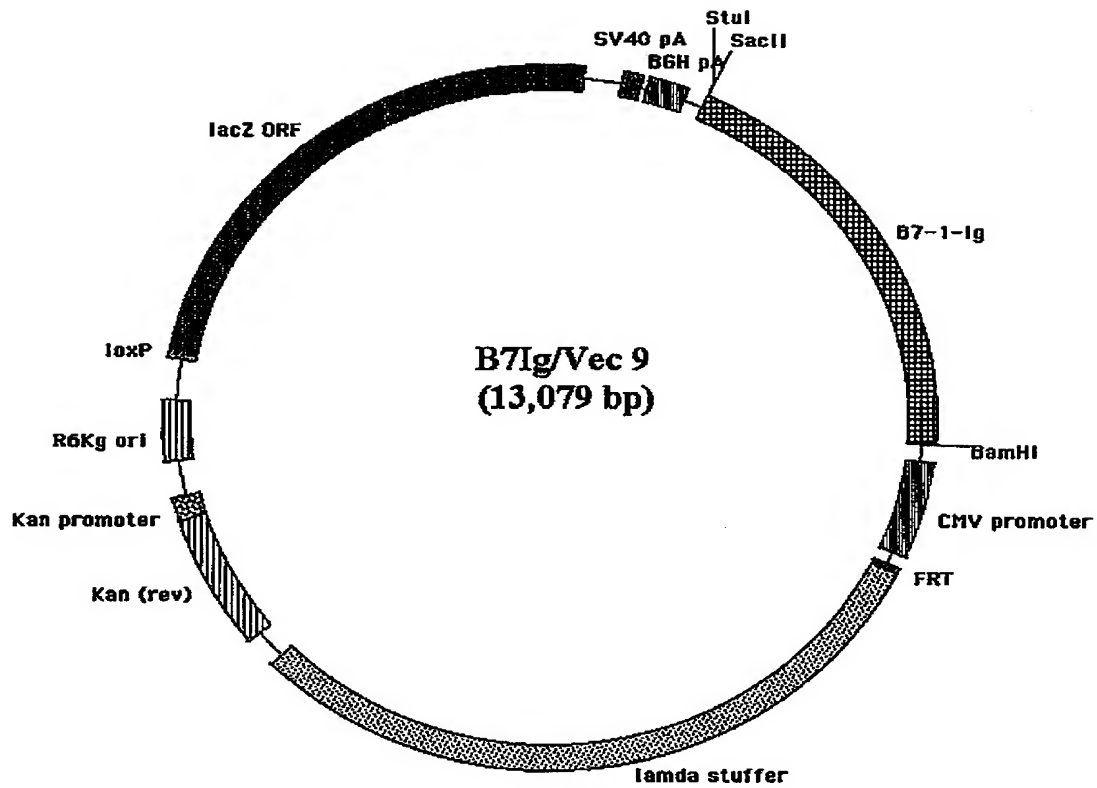
[圖3]



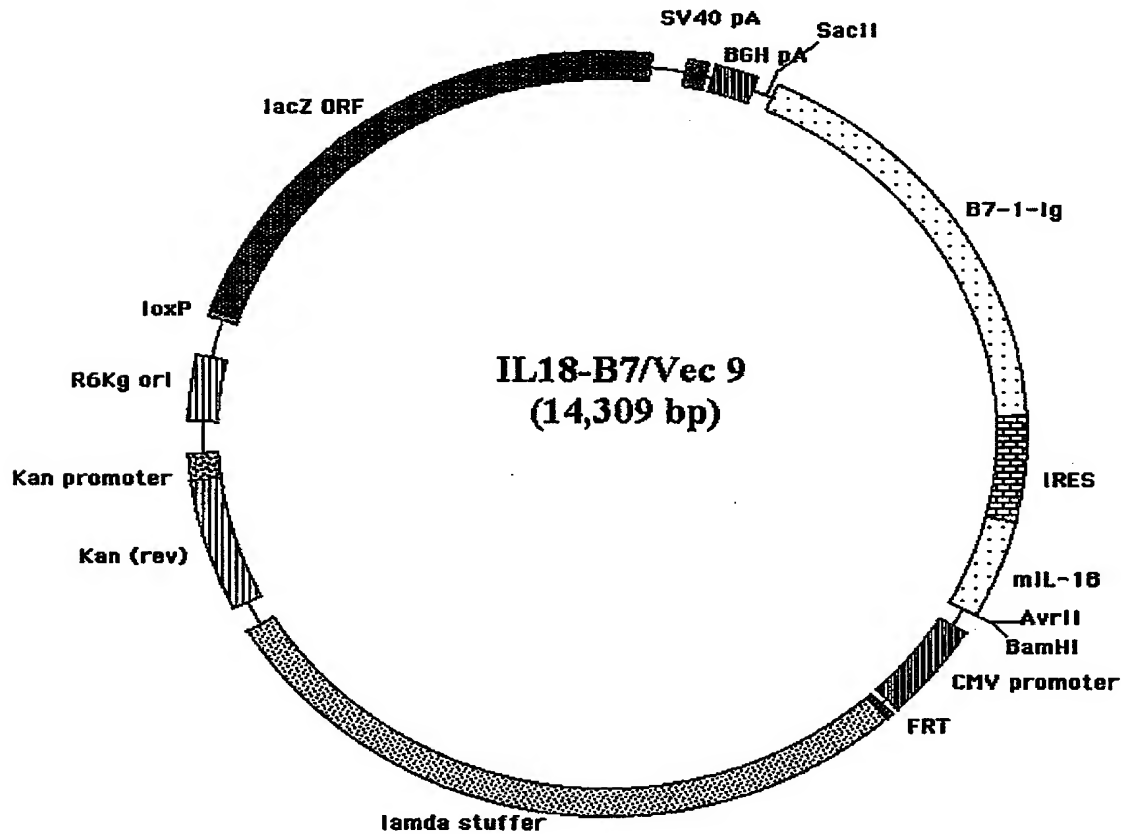
[圖4]



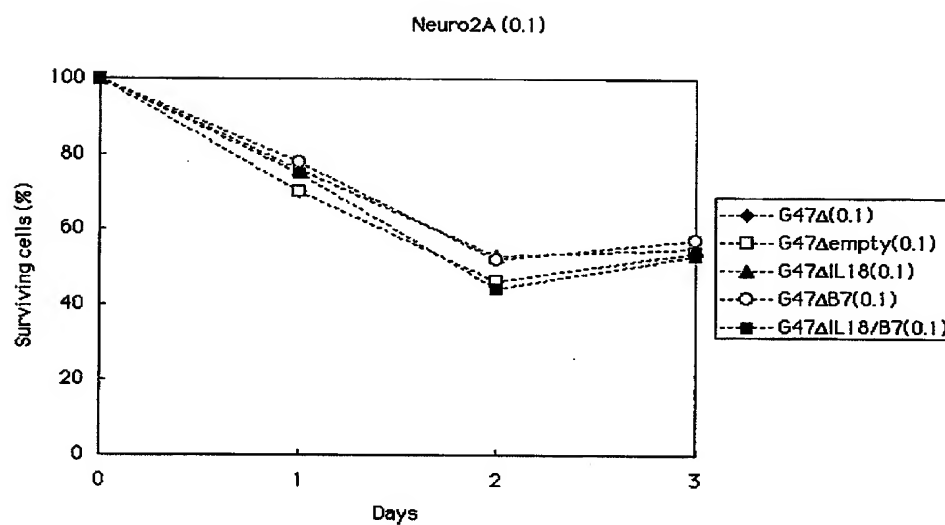
[5]



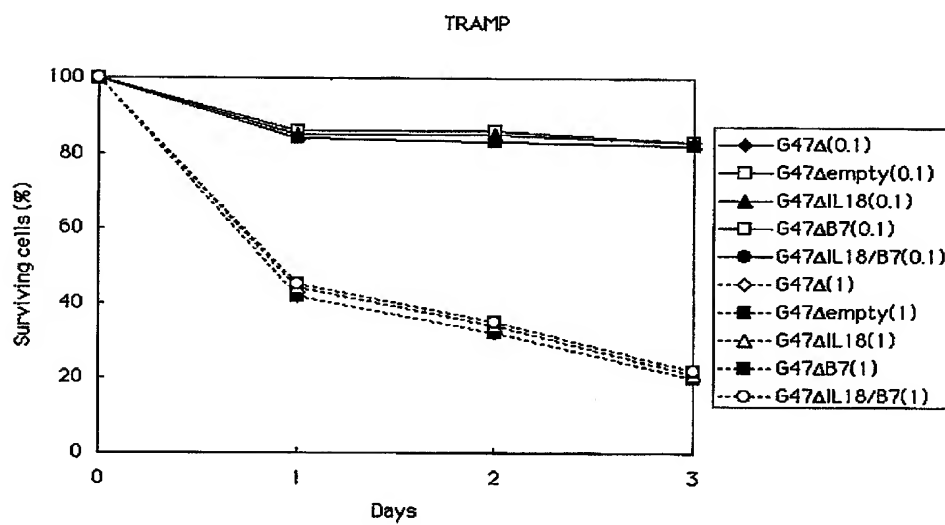
[6]



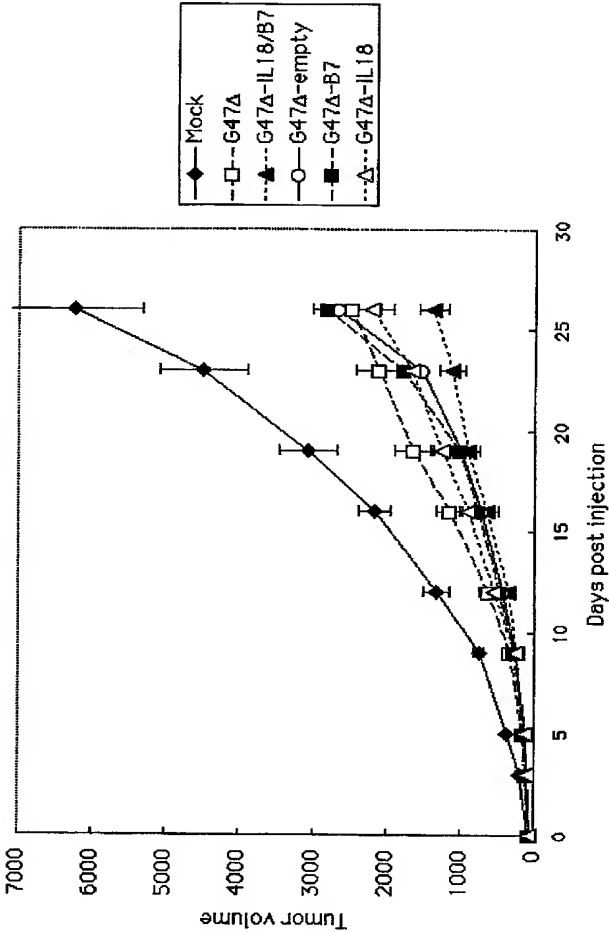
[図7]



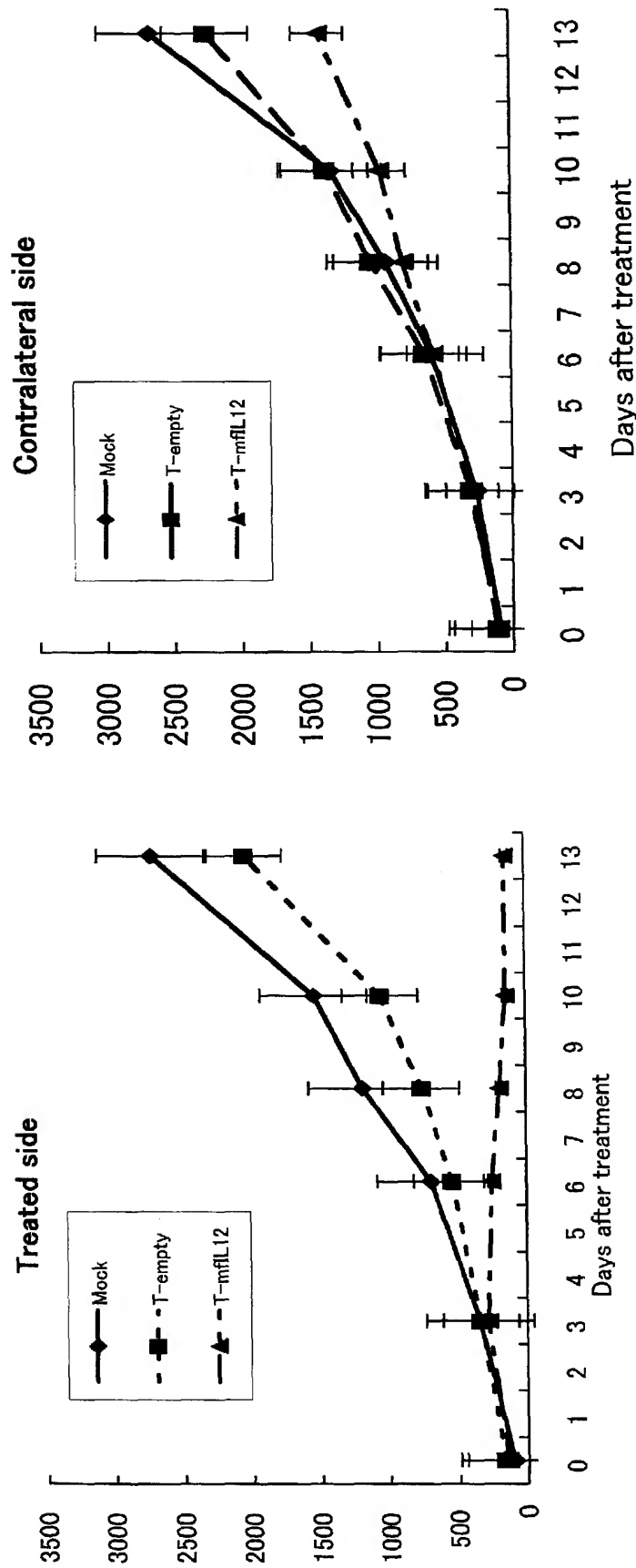
[図8]



[9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N7/01, A61K35/76, A61P35/00, C12N15/869//A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N7/01, A61K35/76, A61P35/00, C12N15/869//A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SAEKI, Y. et al., Development of a rapid method to produce series of oncolytic HSV-1 vectors, Molecular Therapy, 2001, Vol.3, No.5, s45-46	<u>17</u> 1-16, 18, 19
Y	TODA, M. et al., in situ cancer vaccination: an IL-12 defective vector/replication-competent herpes simplex virus combination niduces local and systemic antitumor activity, J.Immunol., 1998, Vol.160, pages 4457 to 4464	1-19
Y	TODO, T. et al., Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing, Proc. Natl.Acad.Sci., USA, 2001, Vol.98, pages 6396 to 6401	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April, 2005 (27.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006396

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TODO, T. et al., In situ expression of soluble B7-1 in the context of oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity, Cancer Res., 2001, Vol.61, pages 153 to 161	1-19
Y	Lauth M. et al., Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases, Nucleic.Acids.Res., 2002, Vol.30, e115	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006396

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertains to 'methods for treatment of the human body by therapy' and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N7/01, A61K35/76, A61P35/00, C12N15/869 // A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N7/01, A61K35/76, A61P35/00, C12N15/869 // A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), JICST ファイル(JOIS), WPI(DIALOG), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Saeki Y. et al., Development of a rapid method to produce series of oncolytic HSV-1 vectors, Molecular Therapy, 2001, Vol.3, No.5, s45-46	17 1-16, 18, 19
Y	Toda M. et al., in situ cancer vaccination: an IL-12 defective vector/replication-competent herpes simplex virus combination induces local and systemic antitumor activity, J. Immunol., 1998 Vol.160, p.4457-4464	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.04.2005

国際調査報告の発送日

17.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3227

C (続き) . . . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Todo T. et al., Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, vol.98, p.6396-6401	1-19
Y	Todo T. et al., In situ expression of soluble B7-1 in the context of oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity, Cancer Res., 2001, Vol.61, p153-161	1-19
Y	Lauth M. et al., Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases, Nucleic Acids Res., 2002, Vol.30, e115	1-19

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲20は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。